

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-503477

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)4月21日

(51) Int.Cl.⁵

C 1 2 P 21/00

識別記号

庁内整理番号

F I

Z 8214-4B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平5-507150
(86) (22) 出願日 平成4年(1992)10月7日
(85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)6月11日
(86) 国際出願番号 PCT/US92/08518
(87) 国際公開番号 WO93/07287
(87) 国際公開日 平成5年(1993)4月15日
(31) 優先権主張番号 775, 136
(32) 優先日 1991年10月11日
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, SE), AU, JP

(71) 出願人 プロメガ・コーポレーション
アメリカ合衆国ウィスコンシン州53711,
マディソン, ウッズ・ホロー・ロード
2800
(72) 発明者 トンプソン, デーヴィッド・ブイ
アメリカ合衆国ウィスコンシン州53716,
モノナ, ウェスト・ディーン・アベニュー
611
(72) 発明者 ヴァン・オースブリー, トーマス・アール
アメリカ合衆国ウィスコンシン州53705,
マディソン, コモンウェルス 2123
(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外5名)

(54) 【発明の名称】 真核無細胞抽出物中での転写と翻訳の共役

(57) 【要約】

真核無細胞抽出物からなる溶液を使用して、マグネシウム濃度をRNAがDNAから転写されそしてRNAがタンパク質に翻訳される値に高めるのに十分な量のマグネシウム化合物を上記抽出物に添加することからなるDNAから転写と翻訳を共役させる方法。

請求の範囲

1. RNAがDNAから転写され且つRNAがタンパク質に翻訳される水準にマグネシウム濃度を高めるのに十分な量のマグネシウム化合物を真核無細胞抽出物に加えることからなる上記抽出物中でDNAからの転写と翻訳を共役させる方法。
2. 上記抽出物がウサギ網状赤血球溶解物である請求項1に記載の方法。
3. 上記最終マグネシウム濃度が約2.5mMから約3.5mMである請求項2に記載の方法。
4. 上記最終マグネシウム濃度が約2.6mMから約3.0mMである請求項2に記載の方法。
5. ポリアミンが上記溶解物に添加される請求項2に記載の方法。
6. 上記ポリアミンがスベルミジンである請求項5に記載の方法。
7. 上記スベルミジンを上記溶解物に加えて約0.2mMから約0.4mMの濃度にする請求項6に記載の方法。
8. 上記溶解物のカリウム濃度を約40mMから約100mMに調整する請求項2に記載の方法。
9. 内因性リボヌクレアーゼを効果的に不活性化するのに十分な量のリボヌクレアーゼインヒビターを上記溶解物に添加することを含む請求項2に記載の方法。
10. 上記リボヌクレアーゼインヒビターがRNasinである請求項9に記載の方法。
11. 転写と翻訳の共役に必要な追加成分を上記溶解物に添加することを含む請求項2に記載の方法。
12. 上記追加成分の1つがRNAポリメラーゼからなる請求項11に記載の方法。
13. 上記ポリメラーゼがSP6、T7およびT3 RNAポリメラーゼからなる群から選択される請求項12に記載の方法。
14. DNA断片が上記溶解物に添加される請求項2に記載の方法。
15. 上記DNA断片が複数のクロニング領域を有する請求項14に記載の方法。
30. 上記リボヌクレアーゼインヒビターがRNasinである請求項29に記載の方法。
31. 転写と翻訳の共役に必要な追加成分が上記溶解物に添加されることを含む請求項22に記載の方法。
32. 上記追加成分の1つがRNAポリメラーゼからなる請求項31に記載の方法。
33. 上記ポリメラーゼがSP6、T7およびT3 RNAポリメラーゼからなる群から選択される請求項32に記載の方法。
34. DNA断片が上記抽出物に添加される請求項22に記載の方法。
35. 上記DNA断片が複数のクロニング領域を有する請求項34に記載の方法。
36. ポリメラーゼプロモーター配列が上記複数のクロニング領域の1方の末端に位置している請求項35に記載の方法。
37. 上記複数のクロニング領域へのクロニングによってRNAポリメラーゼプロモーターが5'末端にそしてポリA配列が3'末端に位置する遺伝子が生じるように、上記断片が上記複数のクロニング領域の反対側末端にポリA配列を有する請求項36に記載の方法。
38. 上記プロモーター配列に対応しているポリメラーゼが上記抽出物に添加される請求項36に記載の方法。
39. 上記DNA断片が、ポリメラーゼ反応として知られる方法によって製造された超コイル分子、共有的閉環状分子、環状分子またはDNA断片からなる群から選択される形態である請求項34に記載の方法。
40. DNAからRNAの翻訳を可能にするのに十分な量のリボヌクレオチド三リン酸が上記抽出物に添加されることを含む請求項22に記載の方法。
41. 上記リボヌクレオチド三リン酸が0.4mMのCTP、0.4mMのUTP、0.5mMのGTPおよび1.6mMのATPの値で上記抽出物に添加される請求項40に記載の方法。
42. 請求項1に従って調製された、修正された真核無細胞抽出物。
43. 請求項42に記載の抽出物を含有する容器からなるキット。

16. ポリメラーゼプロモーター配列が上記複数のクロニング領域の1方の末端に位置している請求項15に記載の方法。

17. 上記複数のクロニング領域へのクロニングによってRNAポリメラーゼプロモーターが5'末端にそしてポリA配列が3'末端に位置する遺伝子が生じるように、上記断片が上記複数のクロニング領域の反対側末端にポリA配列を有する請求項16に記載の方法。

18. 上記プロモーター配列に対応しているポリメラーゼが上記溶解物に添加される請求項16に記載の方法。

19. 上記DNA断片が、ポリメラーゼ反応として知られる方法によって製造された超コイル分子、共有的閉環状分子、環状分子またはDNA断片からなる群から選択される形態である請求項14に記載の方法。

20. DNAからRNAの転写を可能にするのに十分な量のリボヌクレオチド三リン酸が上記溶解物に添加されることを含む請求項22に記載の方法。

21. 上記溶解物に上記リボヌクレオチド三リン酸が各々0.4mM添加される請求項20に記載の方法。

22. 上記抽出物が小変形赤血球抽出物である請求項1に記載の方法。

23. 上記最終マグネシウム濃度が約3.0mMから約5.25mMである請求項22に記載の方法。

24. 上記最終マグネシウム濃度が約4.0mMから約4.75mMである請求項22に記載の方法。

25. ポリアミンが上記抽出物に添加される請求項22に記載の方法。

26. 上記ポリアミンがスベルミジンである請求項25に記載の方法。

27. 上記スベルミジンを上記抽出物に添加して約0.2mMから0.9mMの濃度にする請求項26に記載の方法。

28. 上記抽出物のカリウム濃度が約50mMから約150mMに調整される請求項22に記載の方法。

29. 内因性リボヌクレアーゼを効果的に不活性化するのに十分な量のリボヌクレアーゼインヒビターが上記溶解物に添加されることを含む請求項22に記載の方法。

44. 請求項5または請求項25に従って調製された、修正された真核無細胞抽出物。

45. 請求項44に記載の抽出物を含有する容器からなるキット。

46. 請求項12または請求項32に従って調製された、修正された真核無細胞抽出物。

47. 請求項46に記載の抽出物を含有する容器からなるキット。

48. 特定のポリメラーゼプロモーター配列を有するDNA断片から溶液中で転写と翻訳の共役によってタンパク質を製造する方法であって、該方法は真核無細胞抽出物の単一的な調製物の溶液を調製し、転写と翻訳を支えるのに十分な濃度のリボヌクレオチド三リン酸、アミノ酸および上記断片DNAの上記プロモーターに対応しているポリメラーゼで上記抽出物溶液を修正し、そしてRNAが上記DNA断片から転写され且つ該RNAがタンパク質に翻訳される水準に最終マグネシウム濃度を上昇させるのに十分な量のマグネシウム化合物を上記抽出物溶液に添加することからなる方法。

49. 上記抽出物溶液混合物中のマグネシウムの最終濃度が約0.5mM上昇せられる請求項48に記載の方法。

50. 上記抽出物がウサギ網状赤血球溶解物である請求項48に記載の方法。

51. 上記最終マグネシウム濃度が約2.5mMから約3.5mMである請求項50に記載の方法。

52. 上記最終マグネシウム濃度が約2.6mMから約3.0mMである請求項50に記載の方法。

53. ポリアミンが上記溶液に添加される請求項50に記載の方法。

54. 上記ポリアミンがスベルミジンである請求項53に記載の方法。

55. 上記スベルミジンを上記溶液に添加して約0.2mMから約0.4mMの濃度にする請求項54に記載の方法。

56. 上記溶液のカリウム濃度が約40mMから約100mMに調整される請求項50に記載の方法。

57. 内因性リボヌクレアーゼを効果的に不活性化するのに十分な量のリボヌクレアーゼインヒビターが上記溶液に添加されることを含む請求項50に記載の方法。

方法。

58. 上記リボヌクレアーゼインヒビターがR.Nasinである請求項57に記載の方法。

59. 転写と翻訳の共役に必要な追加成分が上記溶液に添加されることを含む請求項50に記載の方法。

60. 上記追加成分の1つがR.N.Aポリメラーゼを含む請求項59に記載の方法。

61. 上記ポリメラーゼがSP6、T7およびT3 R.N.Aポリメラーゼからなる群から選択される請求項60に記載の方法。

62. 上記DNA断片が、ポリメラーゼ反応として知られる方法によって製造された超コイル分子、共有鎖閉鎖分子、鎖状分子またはDNA断片からなる群から選択される形態である請求項50に記載の方法。

63. 上記DNA断片が複数のクロニング領域を有する請求項50に記載の方法。

64. ポリメラーゼプロモーター配列が上記複数のクロニング領域の1方の末端に位置している請求項63に記載の方法。

65. 上記複数のクロニング領域へのクロニングによってR.N.Aポリメラーゼプロモーターが5'末端にそしてポリA配列が3'末端に位置する遺伝子が生じるように、上記断片が上記複数のクロニング領域の反対側末端にポリA配列を有する請求項64に記載の方法。

66. 上記溶液に上記リボヌクレオチド三リン酸が各々0.4mM添加される請求項50に記載の方法。

67. 上記抽出物が小腸胚芽抽出物である請求項48に記載の方法。

68. 上記最終マグネシウム濃度が約3.0mMから約5.25mMである請求項67に記載の方法。

69. 上記最終マグネシウム濃度が約4.0mMから約4.75mMである請求項68に記載の方法。

70. ポリアミンが上記溶液に添加される請求項67に記載の方法。

71. 上記ポリアミンがスベルミジンである請求項70に記載の方法。

明 細 書

真核細胞抽出物中での転写と翻訳の共役

発明の背景

本発明は一般に分子生物学に関し、そして更に詳細には真核細胞溶解物または他の抽出物中で断片DNAからR.N.Aの転写と該R.N.Aの翻訳を共役させることができる新規方法に関するものである。

細胞中の遺伝子の転写と翻訳(発現)に関わる段階は非常に複雑でありそして未だ完全には理解されていない。しかし乍ら、タンパク質をDNAから製造するためには従わなければならない基本的なパターンがある。DNAは最初にR.N.Aに転写され、次いでそのR.N.Aが種々の細胞成分の相互作用によってタンパク質に翻訳される。原核細胞(細菌)では転写と翻訳は「共役しており(coupled)」。これはR.N.AがDNAから転写されている時間中にR.N.Aがタンパク質に翻訳されることを意味する。真核細胞(動物、植物)では、この2つの作用は別個であり、全体の過程ははるかにより一層複雑化されている。DNAは細胞の核内部でR.N.Aに転写されるが、R.N.Aは更にmR.N.Aにプロセッシングされ、そして次いでmR.N.Aはタンパク質に翻訳される核外の細胞質に輸送される。

分子生物学者が遺伝子を単離しクローン化できそして細胞から特定のmR.N.Aまたは「メッセージ」を単離できるので、これらの遺伝子またはメッセージを発現させるために使用し得る系が必要となった。遺伝子の発現は遺伝子の機能と調節を全体的に理解するために重要である。タンパク質を迅速に発現させる方法が現在利用でき、これは遺伝子を操作し次いでその機能に与える操作の影響の研究を可能にしている。産生すべきタンパク質の量、遺伝子が原核生物であるのかまたは真核生物であるのか、およびインビトロ系またはインビボ系の相対的な利点は、発現系を選択するときに研究者が考慮するファクターの幾つかである。系の選択は研究される遺伝子によって影響される。殆どの場合、原核生物遺伝子は原核生物系で最も良く発現され、そして真核生物遺伝子は真核生物系で一層効果良く且つ正確に発現される。これは、多くの調節配列およびプロモーターは類似す

る系で一層効果良く認識されるためである。遺伝子の発現はインビボおよびインビトロ系の両方で達成することができる。

原核または真核細胞を使用するインビボ転写系は利用可能であるが、これらの系は無数の細胞が使用されるので操作が困難である。他方、インビトロ系はDNAまたはR.N.Aをタンパク質に翻訳するために必要な成分を全て含有する原核または真核細胞から製造された無細胞抽出物から製造される。無細胞抽出物は大腸菌(E. coli)のような原核細胞並びにウサギ網状赤血球および小腸胚芽のような真核細胞から調製することができる。無細胞系は、それらの調製に利用できる標準的なプロトコルが存在しそして多数の供給源から市販で入手できるので、非常に一般的である。

大腸菌S30無細胞抽出物はズベイ(Zubay, G. によって最初に記載された(1973, Ann. Rev. Genet., 7巻, 287頁)。これらの抽出物は発現されるべき遺伝子が適当な原核生物調節配列、例えばプロモーターやリボソーム結合部位を有するベクター中にクローン化されたときに使用することができ、原核生物大腸菌無細胞系は、抽出物へのDNAの添加後に転写と翻訳が同時に生じるので、「共役している」と考えられる。大腸菌抽出物中で断片としてR.N.Aを使用するとタンパク質が生成するが、このような反応は共役してはいない。ウサギ網状赤血球溶解物と小腸胚芽抽出物は好ましくは、真核生物遺伝子またはmR.N.Aの発現に使用される。同系共、真核生物系は既に述べたように共役してはいないので、タンパク質翻訳の断片としてR.N.Aを使用することが必要である。

ウサギ網状赤血球溶解物はペルハム(Pelham, R. J. B. およびジャクソン(Jackson, R. J. によって記載された(1976, Eur. J. Biochem., 131巻, 289頁)。この発現系は多分インビトロ翻訳に最も広範に使用されている無細胞系であり、そしてmR.N.A種の同定、それらの産生物の特性決定、転写と翻訳の制御の研究に使用される。シグナルペプチド阻害およびコアグリコシル化のようなプロセッシングはイヌのミクロゾーム膜を標準的な翻訳反応に加えることにより試験される(Walter, P. および Blobel, G. (1983) Meth. Enzymol., 86, 50)。

ウサギ網状赤血球溶解物はまた、アセチル化、イソプレニル化、タンパク質分解および他のリン酸化活性を含む種々の転写後プロセッシング活性も有している(Gla

ss, C. A. Pollard, K. M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2330.

小麦胚芽抽出物はロバート (Roberts), B. C. およびパターソン (Paterson), B. M. によって記載された (1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2330頁)。小麦胚芽の無細胞抽出物は多種のウイルスおよび他の真核生物のRNA並びに真核生物のmRNAのインビトロでの翻訳を支えている。(Anderson, C. 等 (1983) *Meth. Enzymol.* 101, 635)。一般に、小麦胚芽抽出物にはリボヌクレアーゼ活性が存在しているので、小麦胚芽翻訳系の反応混合物中にリボヌクレアーゼインヒビターを含んでいることが必要と見られている。

翻訳研究用のRNAはmRNAを単離するかまたはRNAポリメラーゼプロモーターを有するベクターにクローン化されているDNAからインビトロでRNA転写物を製造するかのいずれかによって得られる。第1の方法は細胞から直接mRNAまたは「メッセージ」を単離する。

第2の方法はインビトロ転写によってインビトロ翻訳用のRNAを得る。ファージポリメラーゼプロモーターの後にクローン化されたDNAのインビトロ転写はクリーク (Krieg), P. およびメルトン (Melton), D. によって記載された (1984, *Nucl. Acids Res.*, 12, 7057頁)。これはインビトロ翻訳反応に使用するためにクローン化した遺伝子からRNAを得る標準的な方法となった。この方法は問題のDNAまたは遺伝子が次のRNAポリメラーゼ、即ちSP6、T7またはT3のうちの1つのプロモーターを有するベクター中にクローン化されることが必要である。次いで、このベクターはクローン化された遺伝子の3'末端で制限酵素を使用して線状化され、次いでインビトロ転写反応によってRNA転写を行う。SP6、T7およびT3 RNAポリメラーゼプロモーターを有する多数のベクターは市販で入手可能でありそしてDNAのクローニングに応用で使用されている。

いずれにしても、ウサギ網状赤血球溶解物または小麦胚芽系に使用されるRNA転写物を得るプロセスは翻訳反応の効率に影響を与える要素を導入する。RNAはリボヌクレアーゼで容易に分解されるので、RNAを用いて操作するときには常に特別の注意を払わなければならない。DNAははるかに安定である。

さなければならない。このタイプの系はRNAを単離するとき大腸菌S30抽出物および小麦胚芽抽出物で良好に作用する。スピリン (Spirin) 等 (1988, *Science*, 242, 1162~1164参照)。このシステムはまたウサギ網状赤血球溶解物でRNAを単離して使用しても作用する。リャボバ (Ryabova) 等 (1989, *Nucl. Acid Res.*, 17, 11, 4412参照)。この系はまた大腸菌S30抽出物中でDNAを単離して使用しても良好に作用することが知られている。バラノフ (Baranov) 等 (1988, *Gene*, 84, 463~466参照)。PCT公開WO9102076は真核生物溶解物を使用するDNA複製からの連続的な無細胞翻訳を開示している。

連続反応は10時間から約100時間まで種々に実施され、そして組み立て且つ実施するためには時間および供給源のかかりの投資が必要である。「連続」系での翻訳はまた大量のタンパク質を産生させる方向にも向けられており、そして標準的な(静置)インビトロ翻訳反応とかなり異なっている。静置反応は少ない反応容量で、典型的にはマイクロリットルで測定される量で行うことができ、そしてそれはしばしば1乃至2時間で完結される。静置翻訳反応は微量量(ミリグラム)のタンパク質を産生する方向には向けられていない。静置反応は一般に、研究的使用、例えばmRNA種の同定、特徴決定または転写若しくは翻訳制御の研究用にタンパク質を産生させるために使用される。インビトロ翻訳で現在知られているウサギ網状赤血球系または小麦胚芽系はいずれも、静置反応混合物中で転写と翻訳の共役を提供していない。

発明の要約

それ故、本発明の1つの目的は標準的なインビトロ翻訳反応で真核細胞溶解物を使用して鋳型DNAからタンパク質を製造する簡単な方法を提供することである。

本発明の更に特定の目的は、DNA鋳型によってコードされる単一のタンパク質の転写と翻訳を共役させるために使用できる上記方法を提供することである。

もう1つの目的は真核細胞溶解物を使用する転写と翻訳の共役反応によって、DNA鋳型からインビトロでのタンパク質の産生が高い方法を提供することである。

更にもう1つの目的は、転写と翻訳の共役実験に使用される真核細胞溶解物を

ウサギ網状赤血球溶解物および小麦胚芽抽出物が無細胞翻訳系として開発された後、転写と翻訳を共役させる試みがなされた。開発された1つの系は「連結されている(linked)」転写と翻訳系であった (Roberts, B. C. 等 (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1922~1926)。この系は小麦胚芽抽出物を使用することに係わるものでありそして大腸菌のRNAポリメラーゼを使用するSV40ウイルスDNAの転写と翻訳を考慮していた。この系では転写は小麦胚芽抽出物の添加直前の15分のインキュベーション段階で生じる。これらの段階は転写に必要な緩衝液条件と翻訳に必要な緩衝液条件との間の不適合性のため、そして更には両プロセスの温度要件が異なるために分離されている。この系には多くの欠点がある。1つは、多数の異なるタンパク質が同一のSV40DNA鋳型から同時に合成されるので、タンパク質産生物の産生が制御されていないことである。この研究の著者は共役系が開発されたことを示しているが、共役系のデータは示されなかった。

もう1つの系はベルハム, M. B. 等によって開発され (1978), *Eur. J. Biochem.*, 82, 189~208、その際転写と翻訳の共役はワクシニアウイルスコア粒子をウサギ網状赤血球溶解物に導入した後に生じた。ウイルスDNAからワクシニアタンパク質の産生は多分内因性ワクシニアRNAポリメラーゼによる転写とそれに続く溶解物による翻訳によるものであった。この系は、ワクシニア以外の供給源の外因性DNAはRNAポリメラーゼによって認識されないで転写または翻訳が生じせず、ワクシニアタンパク質だけが産生されるという事実によって制限された。ウイルスコア粒子は単離しなければならない、そしてこの著者は単一のタンパク質だけを専ら産生させることはできなかった。

タンパク質の大規模産生に重点をおいた「連続的な」無細胞インビトロ翻訳系を使用する研究も記載されている。連続系はより通常のバッチタイプまたは含まれている反応容量中で生じる静置インビトロ翻訳反応とは非常に異なっている。連続的翻訳は、大規模反応が組み立てられそしてタンパク質が長期間に亘って「連続的に」翻訳されるバイオフィクター (例えばAmicom 88C 限外ろ過ユニット) に係わるものである。この反応には、反応の進行につれて反応中に緩衝液を供給する必要があり、そしてまた翻訳の産生物も反応フィルターユニットから取り出

製造する方法を提供することである。

更に尚もう1つの目的は転写と翻訳の共役反応に必要な1つまたはそれ以上の成分または試薬を有する上記溶解物調製物を製造する方法を提供することである。

もう1つの目的は転写と翻訳の共役実験に使用される上記調製物を提供することである。

本発明の更にもう1つの目的は調製されたウサギ網状赤血球溶解物または小麦胚芽抽出物を有しそしてDNA鋳型から転写と翻訳を共役させる反応混合物を製造するのに必要な他の成分若しくは試薬を含有するキットを提供することである。

更に特定の目的は少なくとも1つの成分として、転写と翻訳を共役させるのに必要な1つまたはそれ以上の試薬を有する調製されたウサギ網状赤血球溶解物または小麦胚芽抽出物調製物を有するキットを提供することである。

上記の目的や他の目的を達成するために、本発明は真核細胞溶解物中で転写と翻訳を共役させる方法を提供する。本方法は、RNAがDNAから転写されそしてRNAがタンパク質に翻訳される量にまで溶解物の最終マグネシウム濃度を高めるのに十分な量のマグネシウム化合物を溶解物に添加することからなる。

本発明はまた、溶液中での転写と翻訳の共役によって、特定のポリメラーゼプロモーター配列を有するDNA鋳型からタンパク質を製造する方法も提供する。これは、真核細胞溶解物の標準的な調製物を製造し、転写と翻訳を支えるのに十分な濃度のリボヌクレオチド三リン酸、アミノ酸および鋳型DNAのプロモーター配列に対応しているポリメラーゼで溶解物を修正し、そしてRNAがDNAから転写され且つRNAがタンパク質に翻訳される量にまで最終マグネシウム濃度を高めるのに十分な量のマグネシウム化合物を上記溶液に添加することによって達成される。DNAのプロモーター配列に隣接する遺伝子に対応するタンパク質だけが製造される。

本発明は更に、RNAがDNAから転写され且つRNAがタンパク質に翻訳される量にまで最終マグネシウム濃度を高める方法に従って調製された修正真核細胞溶解物を提供する。この溶解物は製造中にこのように調整されたマグネシウム濃度を有することができる。本発明はまた、転写と翻訳の共役用の真核細胞調製溶解物を含有する容器からなるキットも提供する。調整されたマグネシウム濃度

を有することに加えて、この溶解物は転写と翻訳の共役に必要な種々の追加成分を含有することができる。含有させることができる追加成分の1つはRNAポリメラーゼである。他のものは種々の緩衝液若しくは塩または転写と翻訳の共役反応条件を最適にする他の成分若しくは試薬、例えば翻訳長の効率を高めることが知られているスベルミジンである。

ウサギ網状赤血球または小麦胚芽系での転写と翻訳の共役化は、RNA類型による標準的なインビトロ翻訳と比較するとき、タンパク質産生を顕著に高め、そして共役した転写と翻訳は広範囲の分子サイズに亘って多様な種々のタンパク質に作用することが示されている。

翻訳される遺伝子またはDNAは好ましくは、SP6、T7若しくはT3プロモーターのようなRNAポリメラーゼプロモーター、またはポリメラーゼが利用可能になる任意のRNAポリメラーゼプロモーターの後でクローン化される。DNA類型は閉鎖状プラスミドDNAの形態でまたは線状プラスミドDNAとして転写と翻訳の共役反応に導入される。RNAポリメラーゼプロモーター配列はまた熱変性増幅方法によって特定のDNAフラグメントに結合させることができ、そしてこれらの線状DNAフラグメントは転写と翻訳の共役反応に使用することができる。

標準的なインビトロ翻訳反応には時間と資源を投資する必要が殆どなく、そして該反応はタンパク質を定性的に発現させるために良好に確立された方法である。標準的なインビトロ翻訳反応でウサギ網状赤血球溶解物または小麦胚芽抽出物を使用して転写と翻訳を共役させることによって、別個のインビトロ転写反応の必要性がなくなり、そしてタンパク質の産生が顕著に高められる。かくして、ウサギ網状赤血球溶解物または小麦胚芽抽出物を使用した転写と翻訳の共役は現行の標準的なインビトロ翻訳反応に比べて顕著な改良を提供する。予期されなかった利益は、所望のタンパク質生成物の産生が標準的なインビトロ翻訳反応にRNAを添加することによって見られる産生に比べて劇的に（数倍）高まることである。更に、共役した転写と翻訳では別個のキャッピング反応の必要がない。

もう1つの利点は、特定のRNAポリメラーゼプロモーターを含有しクローン化されるかまたは増幅されたDNA類型からタンパク質を産生できることである。

性化する。

この溶解物はタンパク質合成に必要な細胞成分を含有している。これらにはtRNA、rRNA、アミノ酸並びに開始、延長および終結因子が含まれる。この溶解物は更に、予め試験したホスホクレアチンキナーゼおよびホスホクレアチンからなるエネルギー発生系を添加することによってmRNA翻訳が最適化される。翻訳され得るmRNAの範囲を拡張するためにtRNAの混合物や開始阻害を阻止するためにヘミンも添加される。ヘミンは開始因子e1F2αのインヒビターのサブレッサーであるので、網状赤血球溶解物に加えられる。ヘミンが存在しないと、網状赤血球溶解物中のタンパク質合成は短期間のインキュベーション後に停止する（Jackson, R. および Bunt, T., 1983 Meth. In Enzymol. 96, 50）。酢酸カリウムおよび酢酸マグネシウムは大部分のmRNA種の翻訳に推奨される量で添加する。これがインビトロ翻訳で使用される標準的なウサギ網状赤血球溶解物である。標準的なウサギ網状赤血球溶解物の最終マグネシウム濃度は典型的には約4.2から3.0mMの範囲であり、該溶解物は転写と翻訳の共役反応では50%比率のものが使用される。

このようにして、プロモーターの下流の単一の遺伝子からRNAを合成するように指令することができ、そしてこのRNAから翻訳されるタンパク質だけが産生される。このRNAが唯一のタンパク質を指令する場合には、該反応によって唯一のタンパク質が産生される。このように使用されるプラスミドベクターは当該技術分野で周知であり、そして幾つかの供給源から入手可能であり、研究者は所望の任意のクローン化遺伝子からタンパク質を産生させることができる。

本発明の他の 徴および利点は、以下の詳細な説明および請求の範囲を検討することによって当業者に明白となろう。

好ましい実施態様の説明

本発明の目的のためには、任意の真核細胞溶解物を使用することができ、そしてそれらを製造するためには多数の慣用の技術が存在する。真核細胞溶解物は多くの理由により、少なくとも部分的にはそれらが種々の翻訳後プロセス活性を保持しているため、好ましい溶解系である。イタのミクロゾーム膜を添加して、シグナルペプチド認識およびコアグリコソル化のようなプロセスを試験することができる。真核細胞溶解物はまた広範囲のウイルスおよび他の原核生物RNA、並びに真核生物mRNAのインビトロでの翻訳を支える。

他の真核生物系も通じているが、ウサギ網状赤血球溶解物および小麦胚芽抽出物が好ましい。これらの真核生物溶解物は研究者に一般的であり、そして広範囲に入手可能である。好ましい実施態様では、ウサギ網状赤血球溶解物はベルラム、H. およびジャクソン, R. J. によって記載され（1976, Eur. J. Biochem. 57, 247-256）そして製造プロトコールL415/L418、プロメガコーポレーション（Promega Corp.）、ウィスコンシン州マディソン、に従って修正された方法によって調製される。網状赤血球溶解物は、フェニルヒドラジンを注射したニュージーランドホワイトラビットから調製され、これによって各ロットで信頼性のある一定した網状赤血球の産生が確保される。網状赤血球は、最終抽出物の翻訳特性を変化させる突然変異を除去するために精製される。網状赤血球を溶解させた後、抽出物はミクロコッカスマクレアーゼおよびCaCl₂で処理して内因性mRNAを破壊し、そしてその結果バックグラウンド翻訳を減少させて最小にする。次いで、EGTAを加えてCaCl₂をキレート化させ、それによってマクレアーゼを不活

ウサギ網状赤血球溶解物（50%溶解物）の翻訳反応における

添加成分の最終濃度寄与

クレアチンリン酸	7mM
クレアチンホスホキナーゼ	35 μg/ml
DTT	1.4mM
ウシ肝臓tRNA	35 μg/ml
酢酸カリウム	56mM
酢酸マグネシウム	350 μM
ヘミン	14.3 μM

もう1つの好ましい実施態様では小麦胚芽抽出物を使用する。これはロバーツ, B. E. およびバタソン, B. M. によって記載されている方法（1973, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70巻, 第8号, 2330-2334頁）、アンダーソン（Anderson), C. W. 等によって記載されている修正（1983, Meth. Enzymol. 101巻, 635頁）に従って、そして製造プロトコールL418、プロメガコーポレーション、ウィスコンシン州マディソン、のように修正して製造することができる。一般に、小麦胚芽抽出物は抽出緩衝液中で小麦胚芽を粉砕し、次いで遠心して細胞破片を除去することによって調製される。次いで、クロマトグラフィーによって翻訳を阻害する内因性のアミノ酸および植物原料から上清液を分離する。この抽出物もバックグラウンド翻訳を減少させて最小にするため更にミクロコッカスマクレアーゼで処理して内因性mRNAを破壊する。この抽出物はtRNA、rRNA並びに開始、延長および終結因子のようなタンパク質合成に必要な細胞成分を含有している。この抽出物は更に、ホスホクレアチンキナーゼおよびホスホクレアチンからなるエネルギー発生系を添加することによって最適化され、そして酢酸マグネシウムは大部分のmRNA種の翻訳に推奨される量で添加する。標準的な小麦胚芽抽出物の最終マグネシウム濃度は典型的には約6.0mMから7.5mMの範囲である。

小麦胚芽抽出物 (50%抽出物) の翻訳反応における
添加成分の最終濃度等

クレアチニン酸	10mM
クレアチンホスホキナーゼ	50 μ g/ml
DTT	5mM
ウシ肝臓 tRNA	50 μ g/ml
酢酸マグネシウム	3.0-3.75mM
酢酸カリウム	50mM
スベルミジン	0.5mM
ATP	1.2mM
GTP	0.1mM
HEPES (pH7.5)	12mM

共役した転写と翻訳では、真核細胞溶解物のマグネシウム濃度は添加されるマグネシウム化合物、好ましくは塩によって調整しなければならない。好ましい塩には塩化マグネシウムおよび酢酸マグネシウムがある。緩衝剤を添加する必要はないが、緩衝剤の添加は pH を安定化させるため役に立つとして使用することができる。転写と翻訳を共役させるために、RNA が DNA から転写されて RNA がタンパク質に翻訳される値に最終マグネシウム濃度を高めるのに十分な量の塩化または酢酸マグネシウムが溶解物に添加される。この値は使用される溶解物に依存して変化する。

標準的なウサギ網状赤血球溶解物または小麦胚芽抽出物に原核生物の RNA ポリメラーゼおよびリボヌクレオチド三リン酸を単に添加しても、インビトロでの DNA 複製からのタンパク質産生は可能でない。しかし、記載されるようにこの系で塩濃度を特別に調整すると、DNA から RNA への転写および RNA からタンパク質への翻訳の両方を可能にする溶解物内の条件がつくられてタンパク質の産生が可能になる。

マグネシウムは集合させたリボソームの安定性をおよびそれらの翻訳中の結合機能を高めるので、翻訳を最適化するのに重要であることが知られている。マグネ

シウムはまたポリメラーゼ結合を促進する役割を果たしていると思われる。翻訳を最適化するにはカリウムも同様に重要であるが、マグネシウムの場合は違って、共役した転写と翻訳ではカリウムイオンの濃度は標準的な翻訳調製物を極めて変化する必要はない。

カリウムとマグネシウムは標準的なウサギ溶解物中に存在している。その値は 1 部は内因性溶解物によるものであり、そして 1 部は翻訳用溶解物に添加されるような溶解物の調製中に含まれた添加によるものである。溶解物は調製中に幾分希釈され、その結果転写と翻訳の共役反応では調製された溶解物は 50% で使用されるにすぎない。

マグネシウム濃度はかなり狭い最適範囲内に調整すべきであるので、溶解物のマグネシウム量は、反応でのマグネシウム量が 1 つの溶解物バッチから次のバッチまで標準化できるように、追加のマグネシウムを添加する前にマグネシウムアッセイを使用して直接測定することが好ましい。ランサー (Lancer) の「マグネシウム ラピッド スタット ダイアグノスティック キット (Magnesium Rapid Stat Diagnostic Kit)」(Oxford Lab Ware Division, Sherrwood Medical Co., ミズーリー州セントルイス) は生物学的液体中のマグネシウム値を正確に測定できるような 1 つのアッセイである。溶解物の所定のバッチのマグネシウムイオン濃度が既知であると、溶解物のマグネシウム濃度を最適範囲内にするためまたは反応混合物の半分として使用される修正溶解物調製物の場合には最適範囲の 2 倍以内にするため、例えば蒸餾されたマグネシウム塩溶液形態の追加的なマグネシウムを既知の方法で添加することができる。

かくして、ウサギ網状赤血球溶解物の最終マグネシウム濃度を例えば、塩化または酢酸マグネシウムの飽和溶液を 2.5mM より多いが 3.5mM 未満、好ましくは 2.5mM から 3.0mM の間の濃度まで添加することによって調整するとき、共役した転写と翻訳が生じることが見いだされた。小麦胚芽抽出物を使用する転写と翻訳の共役化では、約 3.0mM より多いが約 5.25mM 未満、好ましくは約 4.0mM から 4.75mM に調整された塩化または酢酸マグネシウムの最終濃度によってタンパク質が産生される。

転写と翻訳の共役反応の条件には、ウサギ網状赤血球溶解物ではリボヌクレオチド三リン酸 (ATP, GTP, CTP, UTP) およびアミノ酸をそれぞれ各

下させる役割を果たすように思われる。

インビトロ環境での最適マグネシウム濃度は他の条件および理由によっても影響を受ける。例えば、リボヌクレオチド三リン酸濃度が上昇すると、リボヌクレオチド三リン酸が溶液中のマグネシウムと金属するまたはキレートを形成する傾向があるので、最適マグネシウム濃度が付随して上昇する。かくして、上記反応で記載したリボヌクレオチド三リン酸濃度が 0.6mM に上昇するとき、転写と翻訳の共役反応から得られるタンパク質の産生は大いに低下する。マグネシウムの最適濃度はまた細胞溶解物のタイプによって、即ち小麦胚芽抽出物を使用するかまたはウサギ網状赤血球を使用するのによっても変化する。最適値を達成するために添加される必要なマグネシウム量は、溶解物の濃度が上昇すると溶解物それ自体からのマグネシウムの寄与も増加するので、反応混合物中で使用される溶解物の濃度により変化する。

溶解物混合物中には多数の成分があるため、最適な塩条件以外のもので悪い影響を受けるのは RNA からのタンパク質翻訳であるのか、DNA から RNA の転写であるのかまたはそれらの両方であるのかを確実と述べることはできない。検出可能なタンパク質量が反応中に生成しないという観察はいずれの場合でも同じである。マグネシウム濃度を、多分ポリアミン濃度によって、少々調整しそしてリボヌクレオチド三リン酸濃度が問題とならないことを観察することによって、転写と翻訳の共役が観察されるが、これは比較的小さい範囲による場合だけである。

シチオスレイトール (DTT) は好ましくは翻訳混合物に添加される。転写と翻訳の共役反応に加えると、DTT は好ましくは約 1.45mM の最終濃度になるように添加される。最適 DTT は小麦胚芽では約 5.1mM である。更に、R Nasin のようなリボヌクレアーゼインヒビターは内因性リボヌクレアーゼを効果的に不活性化させるために溶解物に添加することができる。反応物 50 μ l 当たり 40 単位の濃度が翻訳の延長を助けることが証明されている。R Nasin はウサギ網状赤血球溶解物中の転写と翻訳の共役には絶対的な要件ではないが、小麦胚芽抽出物を使用する転写と翻訳の共役では必要である。後者から R Nasin を除くと、細胞溶解物中には活性のリボヌクレアーゼが存在しているので、タンパク質翻訳は生じ

0.4mM および各 20 μ M の最終濃度で添加することが含まれる。小麦胚芽抽出物の反応条件は、リボヌクレオチド三リン酸を CTP および UTP で 0.4mM、GTP で 0.5mM として ATP で 1.6mM の最終濃度になるように添加し、一方アミノ酸を 20-80 μ M の最終濃度になるように添加することによって修正される。放射標識したアミノ酸、例えば 35 S メチオニンまたは 3 H ロイシンを共役反応に使用する場合には、対応するアミノ酸はアミノ酸混合物から除く。次いで、SP6、T7 または T3 のいずれかの RNA ポリメラーゼを、好ましくは 50 μ l の反応物当たり約 80-160 ユニットの最終濃度になるように添加する。翻訳される遺伝子を有する DNA 複製は 1 μ g の濃度で添加し、そして反応容量は水を添加して 50 μ l に調整する。次いで、反応物は 30°C で 1-2 時間インキュベートする。

好ましい実施態様ではカリウムが反応混合物に添加されるが、マグネシウムとは対照的に追加的なカリウムはタンパク質産生を余り高めることはなく、適当なマグネシウム濃度が既に存在しているとき僅かな改善を提供するだけである。酢酸カリウムは約 59mM の最適最終濃度になるように添加する。塩化または酢酸カリウムを添加できるが、マグネシウムの場合より多い量を添加するので、酢酸カリウムが好ましい。約 56mM の濃度の標準的な翻訳溶解物を使用することができ、一方スベルミジンは約 0.2mM の最終濃度を与えるように添加される。塩化または酢酸カリウムの最終濃度も標準的な溶解物中の当該成分の量に基づいて既述されるが、この濃度はマグネシウム濃度と同様に内因性成分により僅かに変化するのを認識しなければならない。

転写と翻訳の共役反応の効率または安定性を改善するため所望の追加成分を溶解物に添加することができる。転写と翻訳の共役反応への 1 つの通常の添加は翻訳の効率を高めるのに十分な量のポリアミンである。絶対にそうでなければならないわけではないが、共役した転写と翻訳では、混合物中で約 0.2mM の最終濃度のスベルミジンが最適であり、その際この濃度がタンパク質産生の増加が観察される。ポリアミンも同様に最適のマグネシウム濃度に影響を与え、そしてこれは翻訳反応のマグネシウムの有効濃度を幾分低下させることが知られている。ポリアミンは或る量のマグネシウムに代わることができそしてその結果マグネシウム条件の最適化において、多分転写と翻訳の共役の最適マグネシウム濃度を幾分か低

ない。

ウサギ脳状赤血球溶解物での塩化若しくは酢酸カリウム、塩化若しくは酢酸マグネシウムおよびスベルミジンの好ましい共役転写翻訳濃度は2.5 μ lの最適のトリス/酢酸緩衝液(1xT A緩衝液=33mMのトリス/酢酸 pH7.8、65mMの酢酸カリウム、10mMの酢酸マグネシウム、4mMのスベルミジン、1mMのDTT)を添加して達成することができる。典型的な50 μ lのインビトロ翻訳反応物に上記緩衝液を添加するとき、この緩衝液は溶解物中のマグネシウム量を全体で0.5mM上昇させる。

ウサギ脳状赤血球溶解物は製造中に修正することができる。この溶解物は30%の濃度(典型的には、50 μ lの反応物当たり25 μ lの溶解物)で使用されるので、好ましい修正は酢酸カリウム濃度を118mMに、酢酸マグネシウム濃度を約5.2mMから約6.0mMに、そしてスベルミジン濃度を0.4mMに調整することに俟っている。このことによって、50%溶解物を転写と翻訳の共役反応で使用するとき、59mMの酢酸カリウム、2.8mMから3.0mMの酢酸マグネシウムおよび0.2mMのスベルミジンの最適最終濃度が与えられる。この溶解物はRNAポリメラーゼ(S P 6、T 7またはT 3)の1つを、好ましくは50 μ lの反応物当たり80~160単位の濃度で溶解物に添加することによって更に修正することができる。このような溶解物は必要になるまで冷凍保存することができる。

スベルミジンも好ましくは、最適には約0.9mMの最終濃度で小変異抽出物に添加される。酢酸カリウムは好ましくは約55.5mMの最終濃度まで添加される。これらの濃度は標準的な小変異抽出物中のこれらの成分の量の概算に基づいているが、標準的な小変異抽出物を使用する50 μ lのインビトロ翻訳に5.0 μ lの1xT A緩衝液を添加することによって達成することができ、そして溶解物自体の内因性成分により僅かに変化させることができる。

小変異抽出物はまた、溶解物を50%の濃度で使用するとき、酢酸カリウム、酢酸マグネシウムおよびスベルミジンの最終濃度が小変異抽出物の上記反応条件で上記した濃度と同じであるように、製造工程中で修正することもできる。小変異抽出物はRNAポリメラーゼの1つを1反応当たり80~160単位の最終濃度で添加することによって製造中に更に修正することができる。修正した抽出物は使用

されるまで冷凍保存される。

マグネシウム濃度を標準的溶解物中に存在する値のままにすると、タンパク質の産生は生じない。反応混合物に1xT A緩衝液のマグネシウム以外の他の成分を全て添加するとタンパク質を産生しない反応が生じる。他方、過剰のマグネシウムを添加すると翻訳も一様に停止する。例えば、ウサギ脳状赤血球溶解物を使用する約3.5mMの最終マグネシウム濃度を有する同様な反応混合物では、タンパク質の翻訳も停止する。この上限は多分、カリウムおよびスベルミジン濃度のような他のパラメーター、並びにRNAがタンパク質に翻訳されるための最適マグネシウム濃度を変化させることが知られているリボスクレオチド三リン酸濃度によって僅かに変化する。

修正された小変異抽出物と修正されたウサギ脳状赤血球溶解物は両者共、転写と翻訳の共役反応の組み立てを促進するキットの部分として含めることができる。このようなキットは、高価な溶解物が調製されて使用の準備ができていて、研究者に対する利便性を改善する。ウサギ脳状赤血球溶解物または小変異抽出物に加えて上記キットには、DNA鋳型を導入して転写と翻訳の共役を行うのに必要な成分、試薬(酵素を含む)および緩衝液を含めることができる。溶解物は標準化することができ、または塩濃度の調整が製造中に既に行われているか若しくは更に共役した転写と翻訳に必要な1つまたはそれ以上の成分、試薬または緩衝液も含められているタイプのものであることができる。

共役したインビトロでの転写と翻訳で産生されたタンパク質の量は種々の態様で測定することができる。1つの方法は、翻訳されている特定のタンパク質の活性を測定するアッセイの利用可能性に依存している。タンパク質活性を測定するアッセイの1例はテクニカル ビュレティン(Technical Bulletin) 097、プロメガコーポレーション、ウィスコンシン州マディソン、に記載されているルシフェラーゼアッセイ系である。これらのアッセイはインビトロでの転写と翻訳の共役反応から産生された機能的に活性のタンパク質の量を測定する。活性アッセイでは、不適当なタンパク質の折りたたみのためまたはタンパク質活性に必要な他の翻訳後修正がないため不活性である全長タンパク質は測定されない。

インビトロでの転写と翻訳の共役反応で産生されたタンパク質の量を測定する

もう1つの方法は既知量の³⁵Sメチオニンまたは³Hロイシンのような放射標識アミノ酸を使用しそして被いて、新たに翻訳されたタンパク質に取り込まれた放射標識アミノ酸の量を測定して反応を行うことである。この方法の記載に関しては、ジンビトロ トランスレーション テクニカル マニュアル(the in vitro Translation Technical Manual)、プロメガコーポレーション、ウィスコンシン州マディソン参照。取込みアッセイはインビトロ翻訳反応で産生された全タンパク質(切断されたタンパク質生成物を含む)中の放射標識アミノ酸の量を測定する。タンパク質が上で放射標識タンパク質を分離し、そして生成物が適当な大きさであり且つ二次的タンパク質生成物が産生されていないことをオートラジオグラフィーで確認することが重要である。タンパク質産生の最も正確な測定は、活性測定を取込みの測定と関係付けることである。

上記したように、転写と翻訳の共役反応にはDNA鋳型の導入が必要である。インビトロでのタンパク質翻訳の更なる増強は多数のクロニング領域の1末端にポリA配列を含有するベクターを使用して達成されている。好ましいベクターはまた多数のクロニング領域の反対側末端にS P 6、T 7またはT 3 RNAポリメラーゼプロモーターも含有しているので、ベクター中へのクロニングは5'末端にRNAポリメラーゼプロモーターがそして3'末端にポリA配列が位置している遺伝子を生成させる。クロニングベクターは標準的なインビトロ転写反応に広く使用されるので、商業的に入手可能な多数のクロニングベクターは1つまたはそれ以上のプロモーターS P 6、T 7またはT 3を含有している。ベクターp S P 6 4 (ポリA)はウィスコンシン州マディソンのプロメガコーポレーションから市販で入手可能である。このベクターはルシフェラーゼ遺伝子をクロニングするために使用され、該遺伝子は続いてウサギ脳状赤血球溶解物を使用する転写と翻訳の共役反応で翻訳された。同じルシフェラーゼ遺伝子はポリAを欠く別のベクター中にクロニングさせ、そして続いて転写と翻訳の共役反応で翻訳させた。活性アッセイをこれらの反応から得られた産生物で実施したとき、活性の顕著な上昇がポリA産生物を含有する反応で明白であった。

タンパク質の同時翻訳および初期の翻訳後修正を研究するためには、転写と翻訳の共役反応はイヌ脳ミクロソーム膜の存在下で実施することができる。シグ

ナルペプチド開裂、挿入、トランスロケーションおよびコアグリコシル化は研究できる修正の幾つかである。ミクロソーム膜の存在下で β -ラクターマーゼブリーカーのクロノンを使用する転写と翻訳の共役反応は予期された形態のタンパク質を産生し、シグナルプロセッシングが生じていたことを示した。同様に、ミクロソーム膜の存在下でサッカロミセス・セレビシエ(S. cerevisiae)から得られた α 因子のブリーカーのクロノンを使用する転写と翻訳の共役反応は所期のプロセッシングされた形態のタンパク質を産生し、グリコシル化を示した。

共役した転写と翻訳はタンパク質のインビトロ翻訳を必要とする任意の方法で実施することができる。これらの方法には、得られたタンパク質の構造および機能を研究するための遺伝子のインビトロ突然変異誘発が含まれる。他の方法は反応後からタンパク質を単離するかまたは精製する目的での修正タンパク質のインビトロ翻訳およびタンパク質の抗体を産生させる目的でのタンパク質のインビトロ翻訳である。ウサギ脳状赤血球溶解物または小変異抽出物における共役した転写と翻訳の方法は、これらの点から時間と必要とせずして高い値のタンパク質を産生する点で、現行のインビトロ翻訳方法を越える利点を提供する。

このような修正した転写と翻訳の共役反応を使用することにはまた連続または変動反応を越える多数の利点がある。先ず第1に、2つの系の適用には主要な差異がある。連続系はタンパク質の大規模な工業的製造用であり、一方静置反応は日常の研究者が現在行っているインビトロ翻訳に適する。連続的翻訳は実施はるかにより高価であり、装置の投資(1つのAmicon unitには約2,000米ドルかかる)並びにかなりの量の試薬を必要とする。特に、連続的な真核生物反応を進行するために使用されるRNAポリメラーゼの値は簡単な研究用途には非常に高価なものである(20,000~30,000単位/反応)。連続的反応は比較的大量で行われるように設計されており、一方静置反応は反応容量が典型的には50 μ lまたはそれ未満のオーダーにすぎないので、余分の装置を必要とせず且つ少量の試薬しか必要でない。

連続的反応に必要な時間は24から100時間までのいずれかのかかりのものであり、一方静置反応には完了まで僅か1乃至2時間しか必要でない。研究者が現在実施しているインビトロ翻訳では、静置系はインビトロ翻訳段階を回避すること

によって大部分の分析または他の研究適用で時間のかかりの節約をもたらす。連続的反応の組み立ておよび実施の両方に時間が必要であるため、このような系では転写と翻訳が共役していても典型的な研究者にとって正確な時間は節約されない。更に、転写と翻訳の静置共役系では、RNA 鋳型を使用する標準的なインビトロ翻訳と比較してタンパク質産生の顕著な増加が観察される。DNA 鋳型が3'ポリA配列を有しているとき、タンパク質産生の更なる増加が静置系で観察される。それ故、一般に、費用の有効性および使用の容易さのみならず他の既知の真核生物系を覆える顕著な時間の節約およびタンパク質産生の増加のため、静置共役共役した転写と翻訳を日常の研究室に對し利用可能にする。

実施例 1

共役した転写と翻訳をルシフェラーゼ遺伝子を有するDNA 構築物で実施した。反応はルシフェラーゼアッセイ系（プロメガコーポレーション、ウィスコンシン州マディソン）を使用してルシフェラーゼ酵素の産生をアッセイした。ルシフェラーゼ遺伝子はターナー（Turner）ルミノメーターを使用してターナー光単位で測定される。転写と翻訳の共役は次の反応条件下で達成させた：

25.0 μ l 標準的なウサギ顆粒赤血球溶解液
8.0 μ l rNTP (ATP, GTP, UTP, CTP) 各2.5mM
1.0 μ l SP6 RNA ポリメラーゼ (80単位/ μ l)
2.5 μ l 1xTA 緩衝液*
1.0 μ l RNasin (40単位/ μ l)
1.0 μ l pSP64ポリA/lucDNA (1 μ g)環状プラスミドDNA
1.0 μ l 1mM アミノ酸 (完全)

9.5 μ l H₂O
50.0 μ l

* 1xTA 緩衝液は33mMのトリス/酢酸、pH7.8、85mMの酢酸カリウム、10mMの酢酸マグネシウム、4mMのスペルミジンおよび1mMのDTTからなる。この反応物は30℃で1.5時間インキュベートした。1.5時間後、上記反応から得られた2.5 μ lの試料は、適所に100倍の光フィルターを有するルミノメーター中で

の共役に必要な他の成分（例えば、緩衝液やアミノ酸）は溶解物の製造中に添加できることが示された。添加された成分を有する溶解物は共役反応でタンパク質を産生させるためにDNA 鋳型を導入して使用することができる。

実施例 4

種々のタンパク質の遺伝子を有するDNA 構築物は転写と翻訳の共役反応で試験した。放射標識したアミノ酸（35Sメチオニン）を反応混合物に加えた以外は実施例1と同一の反応条件を使用した。メチオニンはアミノ酸混合物から除いた。反応はSP6またはT7 RNAポリメラーゼプロモーターの後でクローン化されたプラスミドDNA 構築物を使用して実施した。ルシフェラーゼをコードするpGEMLucプラスミドDNAを転写と翻訳の共役反応で使用し、そして放射標識したアミノ酸の15.3%の取込みをもたらした。これを、転写されたルシフェラーゼクローンのRNA 鋳型を使用する標準的なインビトロ翻訳（これは0.8%の取込みをもたらした）と比較した。これらの反応から得られた試料はSDS/PAGEで実験して、タンパク質産生物がルシフェラーゼの適当な大きさであったことが確認された。更なる実験はSP6プロモーターの後の β -ラクタマーゼ遺伝子およびS、セレビスの α 因子のクローンを使用して実施した。 β -ラクタマーゼのRNA 鋳型を使用する標準的なインビトロ翻訳では確認されたアミノ酸の3%の取込みをもたらした。一方DNA 鋳型を使用する転写と翻訳の共役反応では26.8%の取込みをもたらした。 α 因子遺伝子のRNA 鋳型を使用する標準的なインビトロ翻訳反応では0.8%の取込みをもたらしたが、一方DNA 鋳型を使用する転写と翻訳の共役反応では12.4%の取込みをもたらした。更に、反応の試料は産生されたタンパク質の大きさを確認するためSDS/PAGEゲル上で流した。転写と翻訳の共役反応でDNA 鋳型から得られた他のタンパク質には次のものがある：TFIID転写因子、T7プロモーターの後、5%の取込み；CJun転写因子、T7の後、13.4%の取込み； β -ガラクトシダーゼ、SP6プロモーターの後、28%の取込み；およびポリA/luc、ポリAベクター中のルシフェラーゼ遺伝子、SP6の後、25.9%の取込み。

実施例 5

共役した転写と翻訳はイヌのミクロゾーム膜の存在下および不存在下で β -ラ

ッセイした。試料は30,000を超えるターナー光単位を生じさせた。DNAが反応から除かれているかまたは1xTAを含有させない対照実験ではターナー光単位は生じなかった。

実施例 2

共役した転写と翻訳を小麦胚芽抽出物を含有する反応で同様に実施した。また、使用されたDNA 構築物もルシフェラーゼ遺伝子を有していた。転写と翻訳の共役は次の条件下で達成させた：

25.0 μ l 標準的な小麦胚芽抽出物
8.0 μ l rNTP (ATP, GTP, UTP, CTP) 各2.5mM
5.0 μ l 1xTA 緩衝液
1.0 μ l RNasin (40単位/ μ l)
1.0 μ l SP6 RNA ポリメラーゼ (80単位/ μ l)
1.0 μ l pSP64ポリA/lucDNA (1 μ g)環状プラスミドDNA
1.0 μ l 1mM アミノ酸 (完全)

9.5 μ l H₂O
50.0 μ l

反応物は30℃で1時間インキュベートした。1時間後、この反応から得られた2.5 μ lの試料は、適所に100倍の光フィルターを有するルミノメーター中でアッセイした。試料は5,000を超えるターナー光単位を生じさせた。

実施例 3

共役した転写と翻訳はまた成る種の成分または試薬を添加することによって製造中に修正された溶解物を用いても実施した。ウサギ顆粒赤血球溶解物の製造中に、分別物をとり分けそして冷却する前に溶解物にSP6 RNAポリメラーゼを添加した。SP6は25 μ lの溶解物当たり160単位のSP6の量になるように添加した。溶解物は室温で冷却しそして使用するまで-70℃で貯蔵した。転写と翻訳の共役反応はSP6を更に添加しないことを除いて実施例1の条件に従って組み立てた。製造中にSP6 RNAポリメラーゼを添加されたウサギ顆粒赤血球溶解物で実施した反応はタンパク質を産生させた。更なる実験で、転写と翻訳

クマラーゼポリカラーサーのDNA 構築物を使用してウサギ顆粒赤血球溶解物で実施してタンパク質の転写後修正を試みた。これらの反応物はオートラジオグラフィで産生物を視覚化するために標識アミノ酸を有していた。反応物から得られた産生物はSDS/PAGEゲル上で流した。ミクロゾーム膜を有さない反応から得たタンパク質産生物は約31.5キログルトン(Kd)で移動し、一方ミクロゾーム膜を有する反応から得たタンパク質産生物は約28.9Kdで移動し、シグナル配列がプロセッシングされたことを示した。

同様な転写と翻訳の共役実験で、S、セレビスの α 因子のDNA 構築物はイヌのミクロゾーム膜の存在下および不存在下の両方で翻訳させた。更に、放射標識産生物もゲル上で流し、そしてその結果は、18.8Kdのポリカラーサーが22.0Kdで移動するタンパク質にプロセッシングされたことを示し、 α 因子がグリコシル化されたことを示した。

実施例 6

共役した転写と翻訳は、熱増殖増幅方法から得たDNAで実施した。このようなDNAの唯一の要件は増幅されたフラグメントがRNAポリメラーゼプロモーターを有することである。実験はpGEMLucプラスミドから増幅されたDNAフラグメントを使用して実施した。得られたフラグメントはSP6 RNAポリメラーゼプロモーターの配列およびルシフェラーゼ遺伝子の配列を有していた。このフラグメントを実施例1の条件に類似する条件下で共役反応に導入したとき、ルシフェラーゼタンパク質が産生された。T7プロモーターの後のpGEMEX/遺伝子10フラグメント、およびSP6プロモーターの後の β -ガラクトシダーゼフラグメントを含む増幅された他のDNAフラグメントを共役反応で翻訳させた。

本発明の1つの実施形態を記載したが、本発明の精神または下記請求の範囲から離れることなく種々の変更および修正をなすことができることは当業者に明白であろう。

國際調查報告

International Operations No.
PCT/AS/98/116

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
PCT/AS/98/116 US CL. (2000.1) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Abstracts disseminated by specialized information systems followed by classification systems	
13.3 43388.1, 49.1, 37.1	
Documents considered relevant are those, containing information on the subject that such documents are considered to be the State required	
Documents that have been considered during the international search process of this case and, where practicable, patent search results	
DIALOG, JSTOR, MEDLINE, AND SEARCH TERMS COVERED, TRANSLATION, TRANSCRIPTION, IN VITRO	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
1	NO. A. 11/2876 (BARANOV ET AL.) 21 FEBRUARY 1991. SEE ENTIRE DOCUMENT.
2	1. 1. 1. 18.33.33 39. 33-49. 43-45. 30. 53-55. 40. 43. 47.79 33-37.33 3-4. 31. 33-34. 41. 49. 31-32. 56. 68-69. 32.42
3	J. BIOCHEM. VOLUME 82. ISSUED 1971. SUZUKI. "EFFECT OF KCL MAGNESIUM ACETATE AND PERMITS ON THE SATON OF A TO 8 OLIGON CHARGES BY HYDROLYZED". PAGES 131-140. SEE ENTIRE DOCUMENT.
4	VIRUSOLOGY VOLUME 75. ISSUED 1976. BREINOL ET AL. "STUDIES ON THE IN VITRO TRANSCRIPTION AND TRANSLATION OF VESICULAR STOMATITIS VIRUS RNA". PAGES 196-115. SEE ENTIRE DOCUMENT.
D. Further documents are listed in the memorandum of this C. <input type="checkbox"/> See patent family notes.	
A	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
B	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
C	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
D	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
E	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
F	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
G	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
H	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
I	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
J	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
K	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
L	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
M	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
N	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
O	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
P	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
Q	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
R	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
S	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
T	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
U	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
V	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
W	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
X	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
Y	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
Z	Abstracts defined by present state of the art which is not intended to be part of patentable documents.
Date of the latest completion of the international search	
16 January 1993	
Date of mailing of the international search report	
12 JAN 1993	
Author of the report	
DAVID B. SCHWICKEL	
Telephone No. (703) 205-1102	
Patent and mailing address of US ISA/ Examination of Patent and Trademark Office (PTO) Washington, D.C. 20530	
Form PCT/AS/110 (revised March 1992)	

國際調查報告

International Operations No.
PCT/AS/98/116

C. (Continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim 14
A	MOO. NATL. ACAD. SCI. USA. VOLUME 76. NO. 5. ISSUED AUGUST 1979. ROBERTS ET AL. "EFFICIENT TRANSLATION OF TOBACCO MOSAIC VIRUS RNA AND RABBIT GLOMERULONEPHRITIS RNA IN A CELL-FREE SYSTEM FROM COMMERCIAL WHEAT GERM". PAGES 5338-5339. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-43
V	SCIENCE. VOLUME 212. ISSUED 25 NOVEMBER 1980. SHEN ET AL. "A CONTINUOUS CELL-FREE TRANSLATION SYSTEM CAPABLE OF PRODUCING POLYPEPTIDES IN HIGH YIELD". PAGES 1162-1164. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-43
V	NUCLEIC ACIDS RES. VOLUME 17. NUMBER 11. ISSUED JUNE 1989. SYABOVA ET AL. "PREPARATIVE SYNTHESIS OF A CONTINUOUS CELL-FREE SYSTEM FROM RABBIT RETICULOCYTES" PAGE 4412. SEE FIGURE 1.	1-43
V	GENE. VOLUME 84. ISSUED 1989. BARANOV ET AL. "GENE EXPRESSION IN A CELL-FREE SYSTEM ON THE PREPARATIVE SCALE". PAGES 443-444. SEE FIGURE 1, AND ENTIRE DOCUMENT.	1-43

Form PCT/AS/110 (revised March 1992)